



CU09/00016

REPÚBLICA DE CUBA



Ing. María de los Angeles Sánchez Torres, Directora de la **OFICINA CUBANA DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL**.

CERTIFICO: Que bajo el número doscientos ochenta y seis del año dos mil tres del Registro de Entrada, fue presentada en esta **OFICINA CUBANA DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL** la solicitud de Certificado de Autor de Invención, por **PROTEÍNA NMB0928 Y SU USO EN FORMULACIONES FARMACÉUTICAS**, con fecha tres de diciembre de dos mil tres, a las dos horas con treinta y nueve minutos pasado meridiano, por Argia Poveda Marcheco, Representante, ciudadano cubano, a nombre y en representación del **CENTRO DE INGENIERÍA GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA**, cuya invención fue creada por Rolando Pajón Feyt, Gerardo Enrique Guillén Nieto, Gretel Sardiñas García, Lázaro Hiram Betancourt Núñez, Lila Rosa Castellanos Serra, Yasser Perera Negrín, Darién García Díaz, Olivia Niebla Pérez, Evelín Caballero Menéndez y Sonia González Blanco.

ASIMISMO CERTIFICO: Que la mencionada solicitud de Certificado de Autor de Invención, se encuentra actualmente en tramitación.

TAMBIÉN CERTIFICO: Que el Resumen, la Memoria Descriptiva, las Reivindicaciones y los Dibujos que se acompañan, son exactamente iguales a las que obran en el expediente.

Y a petición de Argia Poveda Marcheco, Representante legal, se expide la presente en la Ciudad de La Habana, República de Cuba, a los ocho días del mes de diciembre de dos mil cuatro.


Ing. María de los Angeles Sánchez Torres
Directora
Oficina Cubana de la Propiedad Industrial

BEST AVAILABLE COPY

RESUMEN

PROTEÍNA NMB0928 Y SU USO EN FORMULACIONES FARMACÉUTICAS.

Uso de un nuevo antígeno vacunal aplicado de manera preventiva o terapéutica contra
5 enfermedades bacterianas, virales, cancerosas, o de otro origen.

El objetivo técnico que se persigue es el desarrollo de formulaciones capaces de
elevar el espectro protector de las vacunas existentes y extenderlo contra diferentes
patógenos.

Para lograr este objetivo se aisló e identificó la proteína NMB0928 como componente
10 de las preparaciones de membrana externa de *Neisseria meningitidis*, capaz de inducir
actividad bactericida.

Adicionalmente, se clonó y expresó el gen codificante para la proteína NMB0928, la
cual se purificó evaluándose luego su inmunogenicidad en biomodelos animales. El
secuenciamiento de genes homólogos evidenció, por su elevado grado de
15 conservación, su alto valor como antígeno inductor de una respuesta inmune cruzada
cuando es presentado por diferentes vías. Las formulaciones resultantes de esta
invención son aplicables en la industria farmacéutica como formulaciones vacunales
para uso humano.

20


Lic. Argia Poveda Marcheco
Representante Legal, CIGB

25



MEMORIA DESCRIPTIVA:**PROTEÍNA NMB0928 Y SU USO EN FORMULACIONES FARMACÉUTICAS.**

La presente invención está relacionada con la rama de la medicina, particularmente con el desarrollo de nuevas formulaciones combinadas, de aplicación preventiva o
5 terapéutica, que permitan un aumento en la calidad de la respuesta inmune contra antígenos vacunales contra enfermedades de origen diverso.

Neisseria meningitidis, un diplococo Gram negativo cuyo único hospedero es el hombre, es el agente causal de la meningitis meningocócica. Usualmente esta bacteria se encuentra en estado de portador asintomático en la población, siendo esta
10 la vía más común para su aislamiento microbiológico.

En el mundo los niños menores de 2 años de edad son la población más susceptible a contraer la meningitis meningocócica, sin embargo, los adolescentes jóvenes y la población de adultos mayores también pueden ser afectados.

La enfermedad meningocócica sin tratamiento es fatal en la mayoría de los individuos afectados, y la vacunación podría prevenir esta situación evitando incluso etapas tan
15 tempranas como la colonización bacteriana.

Diversas estrategias se han desarrollado con el objetivo de obtener un preparado vacunal que satisfaga los requisitos necesarios para proteger a la población contra esta enfermedad. Para ello se han tenido en cuenta los antígenos capsulares cuya
20 especificidad inmunológica ha permitido la clasificación de este microorganismo en serogrupos. En la actualidad se han definido 5 de estos serogrupos como los responsables de la mayoría de los casos de enfermedad meningocócica en el mundo. El serogrupo A es el principal responsable de las epidemias en África subsahariana. Los serogrupos B y C están asociados a la mayor parte de los casos que ocurren en
25 los países desarrollados. Los serogrupos Y y W135 están presentes en la mayoría de los casos remanentes de la enfermedad y de infección prevalente en algunas regiones de los Estados Unidos, con un marcado incremento en los últimos años. De ahí que los polisacáridos capsulares hayan sido objeto de estudio y evaluación como candidatos vacunales. Una vacuna tetravalente, basada en polisacáridos, que confiere
30 protección contra los serogrupos A, C, Y, y W-135 ha sido licenciada en los Estados Unidos. Los anticuerpos que son generados tras la vacunación son serogrupo-

específico (Rosenstein N. *et al.* 2001. *Meningococcal disease*. N. Engl. J. Med, 344, 1378-1388).

El serogrupo B, a diferencia del resto, continúa siendo una importante causa de enfermedad meningocócica endémica y epidémica, en gran parte debido a la no existencia de vacunas efectivas contra el mismo. Se ha visto que el polisacárido del serogrupo B posee una baja inmunogenicidad, además del riesgo teórico que existe de que vacunas basadas en este compuesto podrían desarrollar inmunotolerancia e inducir autoinmunidad dada su homología estructural con cadenas oligosacáridas presentes en estructuras fetales humanas (Finne J. *et al.* 1987. *An IgG monoclonal antibody to group B meningococci cross-reacts with developmentally regulated polysialic acid units of glycoproteins in neural and extraneural tissues*. J. Immunol, 138: 4402-4407). Por este motivo, el desarrollo de vacunas contra el serogrupo B se ha concentrado en el uso de antígenos subcapsulares.

Vacunas de vesículas y proteínas de membrana externa

En la década de los años 70 la producción de vacunas de proteínas de membrana externa (PME), estuvo basada en la eliminación del lipopolisacárido (LPS) de las preparaciones proteicas mediante la utilización de detergentes (Frasch CE and Robbins JD. 1978. *Protection against group B meningococcal disease. III. Immunogenicity of serotype 2 vaccines and specificity of protection in a guinea pig model*. J Exp Med 147(3):629-44). Después, las PME fueron precipitadas para producir agregados resuspendidos en cloruro de sodio. A pesar de los buenos resultados obtenidos en estudios realizados en animales, estas vacunas no indujeron anticuerpos bactericidas ni en adultos ni en niños (Zollinger WD, *et al.* 1978. *Safety and immunogenicity of a Neisseria meningitidis type 2 protein vaccine in animals and humans*. J. Infect. Dis. 137(6):728-39), resultado que fue atribuido a la desnaturalización de las proteínas presentes en la preparación como resultado de la precipitación. Los próximos pasos en la búsqueda de un nuevo candidato, fueron: diseñar una vacuna que presenta las proteínas en su conformación nativa formando vesículas de membrana externa (Zollinger WD, *et al.* 1979. *Complex of meningococcal group B polysaccharide and type 2 outer membrane protein immunogenic in man*. J. Clin. Invest. 63(5):836-48, Wang LY and Frasch CE. 1984. *Development of a*

Neisseria meningitidis group B serotype 2b protein vaccine and evaluation in a mouse model. Infect Immun. 46(2):408–14136).

Las vacunas compuestas por vesículas de membrana externa (VME) fueron significativamente más inmunogénicas por vía parenteral que los agregados de PME, y esta inmunogenicidad fue explicada inicialmente por una mayor adsorción al adyuvante hidróxido de aluminio (Wang LY and Frasch CE. 1984. *Neisseria meningitidis* group B serotype 2b protein vaccine and evaluation in a mouse model.. Infect Immun. 46(2):408–14136).

Varios estudios de eficacia se han llevado a cabo utilizando vacunas basadas en vesículas de membrana externa, en diferentes formulaciones. Las dos vacunas más ampliamente estudiadas fueron desarrolladas en los años 80 en respuesta a brotes de la enfermedad meningocócica en Cuba (Sierra GV et al. 1991. *Vaccine against group B Neisseria meningitidis: protection trial and mass vaccination results in Cuba*. NIPH Ann Dis. 14(2):195–210) y Noruega (Bjune G, et al. 1991. *Effect of outer membrane vesicle vaccine against group B meningococcal disease in Norway*. Lancet. 338(8775):1093–6), respectivamente. La vacuna producida por el Instituto Finlay en Cuba (comercialmente denominada VA-MENGOC-BC®) es producida a partir de la cepa B:4:P1.19,15 y está compuesta por una preparación de PME de dicha cepa y polisacárido capsular aislado del serogrupo C, adsorbidas a hidróxido de aluminio (Sierra GV et al. 1991. *Vaccine against group B Neisseria meningitidis: protection trial and mass vaccination results in Cuba*. NIPH Ann Dis. 14(2):195–210). Esta vacuna contribuyó a un rápido descenso de la epidemia en Cuba (Rodríguez AP, et al. *The epidemiological impact of antimeningococcal B vaccination in Cuba*. 1999. Mem Inst Oswaldo Cruz. 94(4):433–40).

La vacuna producida por el Instituto Nacional de Salud Pública de Noruega (NIPH) fue inicialmente utilizada durante un período hiperendémico de la enfermedad causada por una cepa perteneciente al clon ET-5 (B:15:P1.7,16). Esta vacuna monovalente también fue producida a partir de VME purificadas y adsorbidas a hidróxido de aluminio (Bjune G, et al. 1991. *Effect of outer membrane vesicle vaccine against group B meningococcal disease in Norway*. Lancet. 338(8775):1093–6).

Las vacunas de VME parecen ser efectivas en la presentación de PME, dispuestas en su conformación natural, para permitir la generación de anticuerpos bactericidas, al

menos en adolescentes y adultos. Las respuestas de anticuerpos generadas, incrementaron la opsonofagocitosis del meningococo. La formulación precisa de las vacunas (por ejemplo: contenido de PME, contenido de LPS y la presencia o ausencia del adyuvante) tiene un significativo impacto en la inmunogenicidad existiendo grandes diferencias de un productor a otro según la cepa y/o la metodología empleada (Lehmann AK, *et al.* 1991. *Immunization against serogroup B meningococci. Opsonin response in vaccinees as measured by chemiluminescence.* APMIS. 99(8):769–72, Gomez JA, *et al.* 1998. *Effect of adjuvants in the isotypes and bactericidal activity of antibodies against the transferrin-binding proteins of Neisseria meningitidis.* Vaccine. 16(17):1633–9, Steeghs L, *et al.* 1999. *Immunogenicity of Outer Membrane Proteins in a Lipopolysaccharide-Deficient Mutant of Neisseria meningitidis: Influence of Adjuvants on the Immune Response.* Infect Immun. 67(10):4988–93).

Sin embargo, el perfil antigénico de los aislamientos obtenidos de pacientes cambia rápidamente y una vacuna abarca sólo un limitado número de cepas, por tanto puede ser inefectiva en unos años si las cepas que la componen no se corresponden con la epidemia local existente.

Hasta el momento, las vacunas de VME han sido más utilizadas que cualquier otra vacuna del serogrupo B y son útiles en el contexto de los brotes de la enfermedad causada por un solo tipo de cepa.

Los inmunógenos responsables de la reactividad cruzada inducida por este tipo de preparados no han sido completamente caracterizados, y muchos antígenos presentes en estos preparados restan por ser identificados. Estudios realizados con los sueros provenientes de ensayos clínicos del Instituto Finlay y el NIPH, sugieren que los anticuerpos contra la proteína de clase 1 (P1, también llamada PorA) y Opc (otra PME mayoritaria) (Wedegge E, *et al.* 1998. *Immune Responses against Major Outer Membrane Antigens of Neisseria meningitidis in Vaccinees and Controls Who Contracted Meningococcal Disease during the Norwegian Serogroup B Protection Trial.* Infect Immun. 66(7): 3223–31), son importantes mediadores de la actividad bactericida del suero (fundamentalmente P1) y en ambas proteínas se observó una marcada variabilidad de cepa a cepa.

La proteína P1 es un antígeno con un significativo nivel de variabilidad, el cual parece experimentar variación continua entre y durante los brotes (Jelfs J, *et al.* 2000.

- Sequence Variation in the porA Gene of a Clone of Neisseria meningitidis during Epidemic Spread.* Clin Diagn Lab Immunol. 7(3):390–5) y hacia el cual van dirigidos predominantemente los anticuerpos bactericidas después de la vacunación (y después de la enfermedad), por lo que la protección producto de la inmunización con vacunas
- 5 de VME de una sola cepa (monovalentes), las cuales pudieran ser serosubtipo específica (por ejemplo dependientes del tipo de P1), se hace cuestionable. Para resolver este problema se desarrolló una vacuna de VME en Holanda, (RIVM) que contenía P1 de seis aislamientos patogénicos diferentes (Van Der Ley P and Poolman JT. 1992. *Construction of a multivalent meningococcal vaccine strain based on the*
- 10 *class 1 outer membrane protein.* Infect Immun. 60(8):3156–61, Claassen I, et al. 1996. *Production, characterization and control of a Neisseria meningitidis hexavalent class 1 outer membrane protein containing vesicle vaccine.* Vaccine. 14(10):1001–8). En este caso las vesículas fueron extraídas de dos variantes de la cepa H44/76, genéticamente manipulada para expresar tres proteínas P1 independientes.
- 15 *La búsqueda de un antígeno universal*
- Aunque las proteínas de membrana externa (PME) pueden inducir una respuesta inmune funcional contra el serogrupo B, ninguna de las vacunas confiere una protección universal, debido a la gran heterogeneidad de las regiones expuestas en la superficie de las PME. La discreta reactividad cruzada inducida por las vacunas de
- 20 vesículas de membrana externa (VME) ha incentivado la búsqueda de un antígeno de membrana externa (o de un grupo de antígenos), que induzca anticuerpos funcionales y esté presente en todas las cepas del meningococo. Estos antígenos deben ser la base para una vacuna antimeningocócica realmente universal, la cual eliminará el potencial problema de la modificación capsular en las cepas patogénicas, después de
- 25 la vacunación con polisacárido.
- Debido a la variabilidad de la proteína inmunodominante P1, su uso en una vacuna universal esta limitado, y por tanto otras PME mayoritarias fueron consideradas candidatos para una vacuna y muchas de ellas se encuentran en desarrollo. Algunas de las que han sido incluidas son: proteínas de clase 5 (Opc), NspA y proteínas
- 30 reguladas por hierro (TbpA y B, FbpA y FetA). TbpB forma parte del complejo de unión de transferrina, junto con TbpA. Recientes trabajos sugieren que la TbpA tiene una función más importante en la unión al hierro (Pintor M, et al. 1998. *Analysis of TbpA*

and TbpB functionality in defective mutants of *Neisseria meningitidis*. J Med Microbiol 47(9): 757-60) y es un inmunogéno más efectivo que la TbpB.

- Una PME minoritaria, altamente conservada, ha sido descubierta a través de una técnica novedosa, la que consiste en emplear combinaciones de PME provenientes de
- 5 diferentes cepas para inmunizar ratones (Martin D, et al. 1997. *Highly Conserved Neisseria meningitidis Surface Protein Confers Protection against Experimental Infection*. J Exp Med 185 (7): 1173-83). Se utilizaron células B de ratones inmunizados para producir hibridomas, y los mAbs se examinaron para evaluar la reactividad cruzada contra múltiples cepas del meningococo. Como resultado se encontró un
- 10 anticuerpo monoclonal con reactividad cruzada que reconoció una PME de 22 kDa y fue designada como NspA. La inmunización con la proteína NspA indujo respuesta de anticuerpos bactericidas en ratones contra las cepas de los grupos A hasta C y también protege contra la infección meningocócica letal (Martin D, et al. 1997. *Highly Conserved Neisseria meningitidis Surface Protein Confers Protection against*
- 15 *Experimental Infection*. J Exp Med 185 (7): 1173-83). La comparación de secuencias de NspA, genéticamente divergentes, demostró que la proteína está altamente conservada (97% homología) (Cadieux N, et al. 1999. *Bactericidal and Cross-Protective Activities of a Monoclonal Antibody Directed against Neisseria meningitidis NspA Outer Membrane Protein*. Infect Immun 67 (9): 4955-9).
- 20 La presencia de NspA se detectó por ELISA en un 99.2% de las cepas testadas pertenecientes a los serogrupos desde la A hasta la C, utilizando anticuerpos monoclonales (Martin D, et al. 1997. *Highly Conserved Neisseria meningitidis Surface Protein Confers Protection against Experimental Infection*. J Exp Med 185 (7): 1173-83). Se ha comprobado que estos anticuerpos monoclonales presentan actividad
- 25 bactericida contra numerosas cepas del meningococo y son capaces de reducir la bacteriemia provocada por este microorganismo en un modelo murino (Cadieux N, et al. 1999. *Bactericidal and Cross-Protective Activities of a Monoclonal Antibody Directed against Neisseria meningitidis NspA Outer Membrane Protein*. Infect Immun 67 (9): 4955-9). Aunque estos resultados sugieren que la NspA es un
- 30 prometedor candidato vacunal capaz de conferir protección contra varios serogrupos, un suero policlonal de ratón contra la proteína recombinante, no se asoció a la superficie en un 35% de las cepas de meningococo del serogrupo B, a pesar de la

presencia del gen *nspA* en estos organismos (Moe GR *et al.* 1999. *Differences in Surface Expression of NspA among Neisseria meningitidis Group B Strains*. Infect Immun 67 (11): 5664-75).

Presentación de los antígenos y la formulación de la vacuna.

- 5 Los primeros trabajos sugirieron que la forma en que los antígenos eran presentados era muy importante para generar una respuesta inmune. Los epitopos presentes en las proteínas que se encuentran unidas a la membrana, en muchos casos, dependen de la correcta estructura terciaria y la misma a su vez, depende frecuentemente de los dominios hidrofóbicos unidos a la membrana. Este efecto se ha demostrado en
 - 10 preparaciones de PME que resultan inmunogénicas en humanos, sólo cuando se presentan en forma de vesículas (Zollinger WD, *et al.* 1979. *Complex of meningococcal group B polysaccharide and type 2 outer membrane protein immunogenic in man*. J Clin Invest 63 (5): 836-48, Zollinger WD, *et al.* 1978. *Safety and immunogenicity of a Neisseria meningitidis type 2 protein vaccine in animals and*
 - 15 *humans*. J Infect Dis 137 (6): 728-39).
- Durante décadas se han utilizado vacunas integradas por una sola proteína y generalmente han mostrado buena estabilidad, pero la misma puede variar si se requiere la presentación de las proteínas en forma de vesículas para lograr que los antígenos permanezcan unidos a la membrana. La inmunogenicidad y reactogenicidad
- 20 de las VME puede variar con alteraciones en la cantidad de proteínas y LPS eliminadas durante el proceso de purificación. La construcción de vesículas liposomales sintéticas permite la optimización y estandarización de dichas vacunas (Christodoulides M, *et al.* 1998. *Immunization with recombinant class 1 outer-membrane protein from Neisseria meningitidis: influence of liposomes and adjuvants*
 - 25 *on antibody avidity, recognition of native protein and the induction of a bactericidal immune response against meningococci*. Microbiology 144(Pt 11):3027-37). Es decir, las PME han sido presentadas en forma de vesículas y como proteínas expresadas con un elevado grado de pureza, y en ambos casos se ha logrado desarrollar respuesta de anticuerpos. La inyección intramuscular de la vacuna antimeningocócica
 - 30 ha sido la vía utilizada que permite la producción de inmunoglobulina G (IgG) sistémica, aunque es importante la producción de IgA secretora, ya que durante la infección meningocócica la invasión al hospedero ocurre por la vía del epitelio nasal.

Secuenciación del genoma de N. meningitidis

La secuenciación del genoma de MC58 (una cepa de meningococo del serogrupo B) (Tettelin H, *et al.* 2000. *Complete Genome Sequence of Neisseria meningitidis Serogroup B Strain MC58*. Science 287 (5459): 1809-15172) y de Z2491 (una cepa de serogrupo A) (Parkhill J, *et al.* 2000. *Complete DNA sequence of a serogroup A strain of Neisseria meningitidis Z2491*. Nature 404 (6777):502-6173) fueron publicadas durante el año 2000. La disponibilidad de las secuencias de ADN tiene una gran influencia en la investigación de una vacuna antimeningocócica. Mientras la secuenciación del genoma de MC58 continuaba su desarrollo, Pizza y colaboradores comenzaron identificando los marcos abiertos de lectura (ORFs) que fueron predichos para codificar las proteínas expuestas en la superficie, unidas a membrana y las que se exportan. Este grupo de investigadores identificaron 570 ORFs, amplificados a través de la reacción en cadena de la polimerasa y los clonaron en *Escherichia coli*, para permitir la expresión de proteínas de fusión con cola de histidina o glutatión S-transferasa (Pizza M, *et al.* 2000. *Identification of Vaccine Candidates Against Serogroup B Meningococcus by Whole-Genome Sequencing*. Science 287 (5459): 1816-20). El 61% (350) de los ORFs seleccionados fueron expresados exitosamente, en la mayoría de los casos aquellos que no lograron expresarse, tenían más de un dominio hidrofóbico de transmembrana. Las proteínas recombinantes fueron purificadas y se utilizaron para inmunizar ratones. Los sueros obtenidos fueron evaluados por ELISA, citometría de flujo y se les determinó la actividad bactericida contra 2 cepas. Posteriormente se seleccionaron 7 proteínas que en los 3 ensayos resultaron positivas. Las formulaciones vacunales empleando algunas de estas proteínas combinadas con adyuvantes, indujeron títulos significativos de anticuerpos bactericidas contra la cepa homóloga (MC58), pero ninguno de ellos fue tan alto como los inducidos por una vacuna de VME de esta misma cepa (Giuliani MM, *et al.* 2000. Proceedings 12th IPNC. p. 22). Por otro lado, existen evidencias de que combinaciones de estas proteínas resultan más inmunogénicas que cada proteína por separado (Santini L. *et al.* 2000. Proceedings 12th IPNC. p. 25). Los numerosos ORFs excluidos en ese trabajo, quizás por la falta de la expresión proteica o por modificaciones de las propiedades inmunológicas, necesitan una investigación más profunda.

Los componentes de una vacuna deben seleccionarse en base a la contribución de los antígenos en la patogénesis de *N. meningitidis*. Los antígenos por sí solos pueden ser efectivos candidatos vacunales, o alternatively, los mutantes atenuados pueden ser considerados integrantes de una vacuna.

- 5 En este sentido, el empleo de candidatos cuya secuencia esté altamente conservada incluso entre diferentes géneros de microorganismos patógenos, podría resultar una solución a las afectaciones producidas por los mismos en caso de que generen una conveniente respuesta por parte del sistema inmune.

- El objetivo técnico que se persigue con esta invención es precisamente el desarrollo
10 de formulaciones capaces de elevar y/o ampliar la respuesta inmune del organismo contra varios patógenos o contra un espectro amplio de variedades del mismo, siendo estos patógenos de carácter parasitario, bacteriano, viral, canceroso u otro.

Descripción detallada de la invención

- 15 En el trabajo objeto de la presente invención se reporta por primera vez el uso de la proteína NMB0928 como componente de una formulación vacunal de carácter terapéutico o preventivo contra la enfermedad meningocócica o de cualquier infección provocada por un miembro del género *Neisseria*.

- El carácter novedoso de esta invención reside en el uso, previamente no reportado, de
20 la proteína NMB0928 en formulaciones con nuevas propiedades, capaces de inducir una respuesta inmune sistémica y mucosal de amplio espectro protector, dado el carácter conservado de esta proteína en diferentes aislamientos de *Neisseria meningitidis* y *Neisseria gonorrhoeae*.

25 DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

Figura 1. Vector pM100 empleado en el clonaje y la expresión de la proteína NMB0928. pTrip, promotor triptófano; N-term P64k, fragmento N-terminal de la P64k; T4 Terminator, terminador de la transcripción del bacteriófago T4.

30

Figura 2. Construcción final obtenida del clonaje de la secuencia nucleotídica correspondiente al gen *NMB0928* en el vector pM100.

Figura 3. Análisis mediante SDS-PAGE de las fracciones obtenidas en la ruptura celular; carril 1, sobrenadante de ruptura; carril 2, precipitado de ruptura.

- 5 **Figura 4.** Análisis mediante SDS-PAGE del proceso de solubilización de la proteína NMB0928 a partir del precipitado de ruptura: (A) carril 1, precipitado de ruptura; carril 2, precipitado del lavado con solución tampón TE1X que contiene urea 3M ; carril 3, fracción soluble del lavado; (B) carril 1, sobrenadante de solubilización con solución tampón TE1X que contiene urea 6M; carril 2, precipitado de solubilización.

10

Figura 5. Niveles de anticuerpos (IgG) contra la proteína recombinante NMB0928, obtenidos al inmunizar ratones con el mismo antígeno por vía intranasal o intraperitoneal. Se representan los resultados obtenidos en un ensayo tipo ELISA, que fueron expresados como el inverso del título, calculado como la dilución de la muestra
15 donde se duplica la densidad óptica de la muestra preinmune.

Figura 6. Reconocimiento por *Western blotting* de la proteína NMB0928 presente en las PME de *N. meningitidis* utilizando sueros de ratones inmunizados con la proteína recombinante: La flecha indica la banda correspondiente a la proteína NMB0928
20 inmunoidentificada.

Figura 7. Respuesta de anticuerpos IgA contra la proteína recombinante NMB0928, a nivel mucosal, en ratones inmunizados con el antígeno por vía intranasal. Los resultados se expresan como el inverso del título, calculado como aquella dilución de
25 la muestra donde se duplica la densidad óptica de la muestra preinmune. (A) Respuesta de anticuerpos IgA en saliva. (B) Respuesta de anticuerpos IgA en lavados pulmonares

Figura 8. Resultados de la búsqueda de similitud entre el gen NMB0928 ("query") y las secuencias anotadas de los genomas de diferentes serogrupos de *Neisseria meningitidis* ("Sbjct") empleando el programa BLAST.
30

Figura 9. Reconocimiento de la proteína NMB0928 en diferentes cepas de *N. meningitidis*, por sueros producidos contra el antígeno recombinante. En el gráfico sólo se muestran los valores obtenidos cuando se inmunizó con la proteína semipurificada por vía intraperitoneal, aunque en el resto de los casos se observó un comportamiento similar. Los resultados fueron expresados como el inverso del título, calculado como la dilución del suero donde se duplica la densidad óptica del suero preinmune.

Figura 10. Comparación entre los sueros obtenidos inmunizando con la proteína obtenida por dos procedimientos, administrada por vía intraperitoneal, en el experimento de protección pasiva contra infección meningocócica, en el modelo de rata infante.

Figura 11: Reconocimiento de la proteína NMB0928, y de un panel de antígenos no relacionados, por los mAbs generados (mAbs E45-8-15, 2G23-12). P1, proteína de clase 1 de *Neisseria meningitidis* cepa B:4:P1.15; P64k, subunidad E3 de la enzima piruvato deshidrogenasa de *Neisseria meningitidis*; T.T, toxoide tetánico; HBsAg, antígeno de superficie del virus de la Hepatitis B.

Figura 12. Reconocimiento de la proteína NMB0928 por sueros de pacientes convalecientes de la enfermedad meningocócica. Como control negativo se emplearon sueros de donantes sanos. Los resultados se representan como la absorbancia (492nm) en un ensayo tipo ELISA.

Figura 13. Títulos de anticuerpos anti-péptido JY1 correspondientes a los sueros de los animales inmunizados con el péptido libre (JY1), la proteína recombinante (NMB0928) y el conjugado JY1-NMB0928.

Ejemplos.

Ejemplo 1

Detección de la proteína NMB0928 en preparaciones de vesículas de membrana externa de *Neisseria meningitidis*, serogrupo B.

Con el objetivo de estudiar las proteínas presentes en preparaciones de vesículas de membrana externa de *Neisseria meningitidis* serogrupo B (cepa B:4:P1.19,15), se realizó una electroforesis bidimensional según lo descrito en la literatura (Görg A,

et.al. 1985. Electrophoresis 6:599-604). A continuación se realizó una digestión enzimática de las proteínas extraídas del gel empleando la enzima tripsina (Promega ,Madison, WI, E.U). Los péptidos generados durante la digestión fueron extraídos de la solución empleando microcolumnas (ZipTips, Millipore, MA, E.U). Previo al análisis por espectrometría de masas los péptidos fueron eluidos de las microcolumnas con solución de acetonitrilo al 60% y 1% de ácido fórmico e inmediatamente la mezcla se cargó en nanoagujas (Protana, Dinamarca).

Las mediciones se realizaron en un espectrómetro de masas híbrido con cuadrupolo y tiempo de vuelo (QToF-2TM ,Manchester, Reino Unido), equipado con una fuente de ionización (nanoESI). Los espectros de masas fueron adquiridos en un rango de m/z desde 400 hasta 2000 en 0.98 segundos y utilizando 0.02 segundos entre cada uno de los barridos. La adquisición y procesamiento de los datos fue realizada a través del programa MassLynx (versión 3.5, Micromass).

La identificación de proteínas basada en los espectros ESI-MS se realizó empleando el programa ProFound (Zhang W and Chait BT. 2000. *ProFound: an expert system for protein identification using mass spectrometric peptide mapping information*. Anal Chem 72:2482-2489. <http://prowl.rockefeller.edu/cgi-bin/ProFound>). La búsqueda se subscribió a las secuencias de genes y proteínas de bacterias contenidas en las bases de datos SwissProt (<http://www.ebi.ac.uk/swissprot/>) y NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), considerando la oxidación de metioninas, la desamidación y la carboxiamidometilación de cisteínas como posibles modificaciones presentes.

La identificación de las proteínas basada en los espectros MS/MS se realizó a través del programa MASCOT (Perkins DN, *et al.* 1999. *Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data*. Electrophoresis 20:3551-3567. <http://www.matrixscience.com/>). Entre los parámetros de búsqueda se incluyó la modificación de cisteínas así como las posibles oxidaciones y desamidaciones.

A partir del análisis de los datos obtenidos de la identificación de las proteínas presentes en preparaciones de vesículas de membrana externa se seleccionó para evaluar como posible candidato vacunal a la proteína NMB0928, de la cual fue identificado mediante espectrometría de masas 1 péptido.

Ejemplo 2

Identificación del producto del gen nmb0928 como la lipoproteína-34 de *Neisseria meningitidis*

- 5 Para la identificación de la proteína NMB0928, se realizó una búsqueda de similitud de secuencias en la base de datos del NCBI empleando el programa BLAST (Altschul SF, *et al.* 1990. *Basic local alignment search tool*. J Mol Biol 215:403-410, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Los resultados de este procedimiento indicaron homología, además de con las correspondientes proteínas de otros serogrupos de
- 10 *Neisseria*, con las de varios microorganismos entre las cuales se encuentra la lipoproteína-34 codificada por el gen nlpB de *Escherichia coli*, identificada en el año 1991 la cual se demostró que se fracciona en los proteoliposomas de membrana externa (Bouvier J, Pugsley A.P and Stragier, P. 1991. *A gene for new lipoprotein in the dapA-purC interval of the E. coli chromosome*. J Bacteriol 173(17):5523-31)
- 15 La conservación de esta proteína en el genoma de varios géneros microbianos, ha dado lugar a que se reúnan como grupo de proteínas ortólogas en un dominio conservado reportado en la NCBI [gnl|CDD|12651, COG3317, NlpB, Uncharacterized lipoprotein (Cell envelope biogenesis, outer membrana)], lo cual indica un común ancestro filogenético para todas ellas.
- 20 El análisis de la vecindad de estos genes empleando la base de datos MBGD (Uchiyama, I. 2003. *MBGD: microbial genome database for comparative analysis*. Nucleic Acids Res. 31, 58-62.), reveló una significativa similitud en la organización génica, por lo que se identificó a la proteína NMB0928 como la lipoproteína-34 (NlpB) de *Neisseria meningitidis*.

25 Ejemplo 3

Clonaje y expresión del gen *NMB0928*, codificante para la proteína NMB0928 de *N. meningitidis* en *Escherichia coli*.

- Para realizar el clonaje y la expresión del gen NMB0928 se utilizó el vector pM-100, dicho vector permite realizar el clonaje empleando diferentes enzimas de restricción, y
- 30 obtener elevados niveles de expresión de proteínas heterólogas en forma de cuerpos de inclusión citoplasmáticos en *E. coli*.

El vector pM-100 (Figura 1) cuenta con los siguientes elementos principales: promotor triptófano, secuencia correspondiente al segmento estabilizador N-terminal del antígeno P64k de *N. meningitidis* cepa B:4:P1.19,15 codificante para 47 a.a, secuencia correspondiente al terminador de la transcripción del bacteriófago T4 y secuencia
 5 correspondiente al gen que confiere resistencia a ampicilina como marcador de selección.

A partir de la secuencia nucleotídica correspondiente al gen que codifica para la proteína NMB0928 (Ejemplo 1) se procedió a diseñar un par de oligonucleótidos (7740 y 7741) para amplificar el segmento de dicho gen sin la secuencia que codifica para el péptido
 10 señal, utilizando el ADN genómico de la cepa B:4:P1.19,15.

BglII

7740: 5' GCAGATCTTGGCAGCAAAACCGAAC 3'
 (No. Identificación de secuencia: 1)

15

EcoRV

7741: 5' ATGGATATCCTCAGCTCGAGATGGAG 3'
 (No. Identificación de secuencia: 2)

20

Para la predicción del péptido señal se utilizaron los métodos descritos en el SignalP World Wide Web server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-2.0>).

A continuación de la amplificación del gen de la proteína NMB0928 mediante la reacción en cadena de la polimerasa (RCP) (Randall K, *et al.* 1988. Science 42394:487-491) utilizando los oligonucleótidos 7740 y 7741, se digirió dicho producto de RCP empleando las enzimas BglII y EcoRV, y se clonó en el vector pM-100 digerido previamente de la misma forma. La construcción final obtenida se muestra en la Figura 2, la proteína NMB0928 se expresa fusionada con el segmento N-terminal de la P64k. La secuenciación del segmento del gen NMB0928 clonado se realizó empleando el secuenciador automático ALFexpressII (Termo Sequenase™ Cy™ 5 Dye Terminador Kit, Amersham Biosciences) y los oligonucleótidos 1573 (No. Identificación de secuencia: 8) y 6795 (No. Identificación de secuencia: 9), que hibridan en la secuencia correspondiente al segmento estabilizador de la P64k y en el terminador de la transcripción del bacteriófago T4, respectivamente. El plasmidio obtenido se nombró pM-242 para su posterior utilización.

Para la expresión del gen NMB0928 se transformó por el método químico la cepa de *E. coli* GC 366 con el plasmidio pM-242 (Figura 2). El experimento de expresión se realizó en medio mínimo salino M9 (Miller JH. 1972. Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NEW York, USA) suplementado con glicerol al 1%, hidrolizado de caseína al 1%, CaCl₂ 0.1 mM, MgSO₄ 1mM y ampicilina 50 ug/mL. Los cultivos se incubaron durante 12 h a 37°C a 250 r.p.m. Al cabo de este tiempo se centrifugaron y se realizó la ruptura del precipitado celular mediante disrupción sónica (IKA LABORTECHNIK). Fracciones de sobrenadante y precipitado obtenidas fueron analizadas mediante electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) (Laemmli UK. 1970. *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature 227:680) y tinción con Azul Brillante de Coomassie R-250; analizándose el porcentaje de expresión mediante densitometría del gel (LKB Bromma 2202 Ultrascan laser densitometer; Amersham Pharmacia Biotech, Reino Unido). La proteína NMB0928 se obtuvo en el precipitado de ruptura, representando un 60% del total de las proteínas presentes en esta fracción (Figura 3). A continuación el precipitado se lavó con una solución tampón TE 1X (Tris-hidroximetil amino metano 10mM, ácido etilendiamino tetracético 1mM, pH 8) que contiene urea 2M con lo cual algunos contaminantes pasaron al sobrenadante en tanto la proteína de interés permanecía en el precipitado (Fig 4A). Luego dicho precipitado se solubilizó con una

solución tampón TE1X que contenía urea 6M, pasando la proteína NMB0928 a la fracción soluble que se dializó contra una solución tampón TE1X obteniéndose finalmente con un 70% de pureza como se puede observar en la Figura 4B.

5 Ejemplo 4

Evaluación de la respuesta inmune inducida por la proteína NMB0928 por vía intraperitoneal e intranasal.

Para evaluar la inmunogenicidad de la proteína NMB0928, se diseñó un esquema de inmunización en ratones, en el que se administró la misma proteína obtenida por dos métodos diferentes. El primero consistió en extraer la banda de un gel de poliacrilamida (Castellanos L, et al. 1996. *A procedure for protein elution from reverse-stained polyacrylamide gels applicable at the low picomole level: An alternative route to the preparation of low abundance proteins for microanalysis*. *Electrophoresis* 17: 1564-1572) y el segundo se refirió en el Ejemplo 3, cuyo producto se denotó como proteína semipurificada.

Con estas preparaciones se inmunizaron ratones Balb/c hembras, de 8 a 10 semanas de edad, los cuales fueron divididos en 4 grupos de 8 ratones cada uno. Se realizaron 3 inmunizaciones por vía intranasal o intraperitoneal, separadas por un intervalo de 15 días. La proteína administrada por vía intraperitoneal fue mezclada con adyuvante de Freund. En la Tabla 1 se describe la composición de los grupos:

Grupos	Prot. extraída del gel	Prot. semipurificada	Ruta
1	50µg	--	i.n
2	--	50µg	i.n
3	10µg	--	i.p
4	--	10µg	i.p

Tabla1: Grupos de ratones utilizados para la inmunización

Los títulos de anticuerpos (IgG), contra la proteína recombinante y la proteína homóloga presente en la bacteria se determinaron mediante un ensayo tipo ELISA en sueros obtenidos después de la tercera inoculación. En la Figura 5 se muestran los

títulos de anticuerpos de cada uno de los animales contra la proteína recombinante. Después de la segunda inoculación se detectan niveles de anticuerpos, aunque fueron superiores luego de la tercera inoculación. También se realizó la identificación inmunológica por *Western blotting*, detectándose el reconocimiento de la banda correspondiente a la proteína. Los grupos inmunizados por vía intraperitoneal presentaron títulos de anticuerpos significativamente superiores a los grupos inoculados por vía intranasal. Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó el método no paramétrico de análisis de varianza de clasificación simple por rangos de Kruskal-Wallis, debido a que las varianzas entre los grupos no eran homogéneas según la Prueba de Bartlett. En la comparación de las medias de los tratamientos, en las combinaciones necesarias, se empleó la prueba de comparación múltiple de Dunn.

Los sueros obtenidos después de inmunizar con la proteína recombinante reconocieron a la proteína natural presente en un preparado de proteínas de membrana externa (PME) de la cepa CU385. Estos resultados son expuestos en la Figura 6.

Para analizar la respuesta a nivel mucosal se evaluaron muestras de saliva y lavados pulmonares. En la Figura 7 sólo se muestran los grupos inmunizados por vía intranasal y se observa un incremento en el título de IgA en el grupo al cual se le administró la proteína semipurificada.

Ejemplo 5

Caracterización de la secuencia del gen codificante para la proteína NMB0928 en distintas cepas de *N. meningitidis*.

Para analizar la conservación de la secuencia del gen codificante para la proteína NMB0928 en las especies patógenas del género *Neisseria* se realizó una búsqueda de similitud con los genomas de *Neisseria meningitidis* (serogrupos A, B y C) y *Neisseria gonorrhoeae* anotados en la base de datos del NCBI (NC 003116.1, NC 003112.1, NC 003221, NC 002946 SANGER 135720|Contig1) empleando el programa BLAST (Altschul SF, et al. 1990. *Basic local alignment search tool*. J Mol Biol 215:403-410. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). La Figura 8 muestra los resultados de la comparación de secuencias para aquellas secuencias que producen

un alineamiento significativo en cada uno de los genomas analizados. Dichas secuencias presentan un 98% de identidad en los serogrupos A y C, un 99% de identidad en el serogrupo B y un 96% de identidad con *Neisseria gonorrhoeae*, con la secuencia obtenida del gen que codifica para la proteína NMB0928 (No. Identificación de secuencia: 3). Adicionalmente se determinó la secuencia nucleotídica del gen en cuestión para 3 aislamientos cubanos (No. Identificación de secuencia: 5-7) pertenecientes al serogrupo B (B:4:P1.19,15) y se realizó un alineamiento de secuencia empleando el programa ClustalX (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>). Los resultados del alineamiento evidencian que existe una gran conservación en la secuencia nucleotídica del gen NMB0928 entre las distintas cepas analizadas. El empleo de la proteína NMB0928 como candidato vacunal, tomando en cuenta el alto grado de similitud existente entre las secuencias anteriormente citadas, permitiría generar una respuesta inmune efectiva, y de amplio espectro de protección (producto de la reactividad cruzada), contra la enfermedad meningocócica.

15

Ejemplo 6

Caracterización de la respuesta inmune de amplio espectro de acción inducida por la inmunización de ratones Balb/c con la proteína NMB0928.

Con el objetivo de evaluar si la inmunización con la proteína NMB0928 induce una respuesta de amplia reactividad cruzada con otras cepas de *Neisseria*, se realizó un ensayo tipo ELISA en el que las placas de poliestireno se recubrieron con células totales de 7 cepas de *Neisseria* pertenecientes a diferentes serotipos y serosubtipos. Las placas se incubaron con la mezcla de los sueros obtenidos contra la proteína NMB0928 por dos rutas de inmunización, según se describe en el Ejemplo 4.

En la Figura 9 se muestran los resultados obtenidos con los sueros producidos contra la proteína semipurificada administrada por la ruta intraperitoneal. Como se observa los sueros inmunes reconocieron la proteína presente en diferentes cepas, con niveles semejantes al encontrado en la cepa CU385. El resto de los sueros tuvieron un comportamiento similar en este ensayo.

30

Ejemplo 7

Protección inducida por los sueros murinos generados contra la proteína NMB0928, contra cepas homólogas y heterólogas, en el modelo de rata infante

Para determinar la actividad funcional de los antisueros obtenidos, se realizó un ensayo de protección en el modelo de infección meningocócica en ratas infantiles. En dicho ensayo se emplearon 24 ratas de 5 a 6 días de nacidas, divididas en grupos de 6 animales cada uno.

Se determinó si los sueros que se administraron por la ruta intraperitoneal protegían a las ratas de la infección por la bacteria (cepa CU385), inoculada por la misma ruta una hora después. Los sueros de cada grupo de ratones inmunizados se mezclaron antes de ser inoculados en ratas infantiles y se diluyeron 1/10 en PBS estéril. Cuatro horas después del reto, los animales se sacrificaron y se hizo un conteo de las bacterias viables en la sangre.

Para la interpretación de los resultados se realizó un Análisis de Varianza (Anova) seguido de un análisis de comparación múltiple de Dunnet, donde se comparan los grupos en estudio con el control negativo. Como se observa en la Figura 10 los grupos que recibieron los antisueros contra la proteína NMB0928 mostraron diferencias significativas respecto al control negativo, o sea fueron protectores en este modelo.

Un ensayo similar fue realizado infectando las ratas infantiles con las cepas M982 y 120/90, aisladas de pacientes en Cuba, cuya clasificación serológica es homóloga a la cepa B385. Además, se realizaron experimentos de reto con las cepas 233 (C:2a: P1.5) del serogrupo C y la cepa H44/76 (B:15,P1.7,16) del serogrupo B. En todos los casos los antisueros protegieron a las ratas infantiles contra la infección meningocócica.

Ejemplo 8

Generación de anticuerpos monoclonales contra la proteína NMB0928 capaces de mediar actividad bactericida contra *Neisseria meningitidis*

Con el objetivo de generar anticuerpos monoclonales (mAbs) específicos contra la proteína NMB0928, y estudiar su capacidad funcional de mediar actividad bactericida contra cepas homólogas y heterólogas de *N. meningitidis*, se empleó en un esquema de inmunización una preparación de la proteína NMB0928 con un porcentaje de pureza superior al 70% (Ejemplo 3). El esquema de inmunización se realizó en ratones Balb/c

(H-2^d, sexo femenino, 5-6 semanas) y contó con un total de 4 dosis distribuidas de la siguiente manera: los días 0, 15 y 30 del esquema 10 µg del antígeno NMB0928 por ratón (volumen total 100 µl), administrados por vía subcutánea, emulsificada la primera dosis en Adyuvante Completo de Freund, y las restantes dosis con Adyuvante Incompleto de Freund; día 50, 10 µg del antígeno por ratón en solución tampón fosfato (NaCl 140 mM, KCl 270 mM, KH₂PO₄ 1.5 mM, Na₂HPO₄ x 2H₂O 6.5 mM, pH 7.2) por vía intraperitoneal. Las extracciones se realizaron los días 0 y 45 del esquema.

Los esplenocitos del animal de mejor título, evaluados mediante un ELISA indirecto empleando la proteína NMB0928 (Ejemplo 3) en el recubrimiento, se fundieron con las células de mieloma X63 Ag8 653 y los hibridomas resultantes se aislaron y pesquisaron según métodos establecidos (Gavilondo JV. 1995. Anticuerpos Monoclonales: Teoría y Práctica, Elfos Scientiae, La Habana, Cuba).

La reactividad de los anticuerpos secretados por los hibridomas obtenidos contra la proteína NMB0928, así como su reactividad cruzada contra un grupo de antígenos no relacionados, se evaluó mediante un ELISA indirecto empleando en el recubrimiento 5 µg/ml de cada uno de los antígenos, e igual concentración de cada uno de los mAbs a ensayar. La Figura 11 muestra los resultados obtenidos en este experimento, en total se obtuvieron 2 clones positivos (mAbs E45-8-15 y 2G23-12) que reconocen específicamente la proteína NMB0928, y no a la secuencia aminoacídica correspondiente al segmento N-term de la P64k, tampoco al resto del panel de antígenos no relacionados ensayados.

Para determinar la capacidad de los mAbs generados contra la proteína NMB0928 de mediar respuesta bactericida contra cepas homólogas y heterólogas de *Neisseria meningitidis* se realizó un ensayo bactericida. El título de anticuerpos bactericidas fue expresado como el recíproco de la mayor dilución de anticuerpos evaluada, capaz de matar el 50% ó más de las bacterias; el mAb 2G23-12 tuvo títulos bactericidas superiores a 1: 128 contra la cepa homóloga B:4:P1.19,15 y superiores a 1:64 contra las cepas heterólogas B:15:P1.7,16 y C:2a:P1.5.

30 Ejemplo 9

Caracterización de las regiones blanco de la respuesta inmune murina contra la proteína NMB0928

Con el objetivo de identificar las regiones dentro de la proteína, que son más reconocidas por los antisueros murinos generados contra el antígeno recombinante se realizó un ensayo de tipo SPOTScan. Una serie de péptidos sobrelapados que cubren la secuencia de la proteína se sintetizaron sobre un soporte de celulosa y la

5 membrana se incubó con una mezcla de sueros diluída 1:100. La reacción antígeno-anticuerpo se detectó mediante la incubación con un conjugado anti-Inmunoglobulina G murina- fosfatasa alcalina, seguido de la adición de una solución que contenía el sustrato Bromo-Cloro-Indolil-Fosfato.

Se observaron varias regiones antigénicas comunes presentes en la proteína, con

10 independencia de la preparación que se empleó en la inmunización. No obstante, se apreció que en los grupos inmunizados con proteína adyuvada con Adyuvante de Freund se obtuvo un patrón de reconocimiento mucho más amplio.

Ejemplo 10

15 Reconocimiento de la proteína NMB0928 por sueros humanos.

Una batería de sueros humanos, provenientes de individuos convalecientes se empleó en este estudio, que se realizó en un ensayo tipo ELISA. Las placas se recubrieron con la proteína NMB0928 obtenida mediante electroforesis preparativa (5 µg/ml). Después de bloquear las placas con leche descremada en polvo al 3% en PBS con

20 Tween-20, los sueros se diluyeron (1:50) en la misma solución y se incubaron en las placas. El inmunoensayo prosiguió como ha sido ampliamente reportado. Como control negativo se emplearon sueros de donantes sanos. También se empleó como control no relacionado una mezcla de sueros de vacunados con vacuna recombinante contra la Hepatitis B (datos no mostrados).

25 La Figura 12 muestra los resultados obtenidos con 5 sueros de convalecientes en este ensayo. Como se aprecia, los sueros humanos reconocieron la proteína lo que indica que la misma se expresa durante la infección meningocócica y que es inmunogénica.

Ejemplo 11

30 Proteína NMB0928 como portadora de un péptido.

Para demostrar la capacidad portadora de la proteína recombinante NMB0928, se conjugó a la misma un péptido sintético de 15 residuos aminoácidos, derivado de la

región V3 de la proteína gp120 del VIH-1, aislamiento JY1. La conjugación se realizó por el método del glutaraldehído. El péptido JY1 libre, la proteína recombinante NMB0928 y el conjugado JY1-NMB0928, se administró a ratones adultos en un esquema de 3 dosis, donde los inmunógenos se emulsificaron con Adyuvante de Freund. Dos semanas después de la tercera dosis se obtuvieron muestras del suero de los animales inmunizados, los que se analizaron por ELISA para determinar los niveles de anticuerpos anti-péptido. Para ello las placas se recubrieron con el péptido libre (20µg/ml) y el inmunoensayo prosiguió como se ha descrito previamente. Los resultados del experimento (Figura 13) evidencian la capacidad portadora de la proteína NMB0928, capaz de potenciar significativamente la respuesta de anticuerpos contra el péptido JY1, tras su conjugación al mismo.

15 Lic. Argia Poveda Marcheco
Representante Legal, CIGB



LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología
- 5 <120> PROTEÍNA NMB0928 Y SU USO EN FORMULACIONES FARMACÉUTICAS
- <130> NMB0928
- 10 <140>
<141>
- <160> 9
- 15 <170> PatentIn Ver. 2.1
- <210> 1
<211> 32
<212> ADN
- 20 <213> Secuencia artificial
- <400> 1
gcagatcttg gcagcaaaac cgaac 25
- 25 <210> 2
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 30 <400> 2
atggatatcc tcagctcgga atggag 26
- 35 <210> 3
<211> 1197
<212> ADN
<213> Neisseria meningitidis
- <400> 3
- 40 atgccgtccg aaccgttcgg acggcataac gcaacaaaca ctftaatatc catcacacag 60
gatgacacga tgacctatat caaacccgctc attgccgcgc tcgcactcat cgggcttgcc 120
gctgctccg gcagcaaaac cgaacagccc aagctcgact accaaagccg gtgcaccgc 180
ctgatcaaac ttgaagtccc acctgattg aacaacccc accaaggcaa cctctaccgc 240
ctgcctgccg gttcgggcgc cgtccgcgc agcgatttg aaaaacgccg cacaccgcc 300
- 45 gtccaacagc ctgccgatgc cgaagtattg aaaagcgtca aaggtgtccg cctcgagcgc 360
gacggcagcc aacgctggct cgtgtcgac ggcaagtctc ctgccgaaat ctggccgctc 420
ctgaaagcct ttggcagga aaacggcttc gacatcaaat ccgaagaacc cgccatcgga 480
caaatggaaa ccgagtgggc ggaaaaccgc gccaaaatcc cccaagacag cttgcgccgc 540

ctcttcgaca aagtcggcctt gggcggcatc tactccaccg gcgagcgcgga caaattcatc 600
 gtccgtatcg aacagggcaa aaacggcggtt tccgacatct tctcgcca caaagccatg 660
 aaagaagtgt acggcggcaa agacaaagac acgaccgtat ggcagccctc cccgtccgat 720
 cccaacctcg aagccgcttt cctgacgcgc ttatgcaat attgggcgt tgacggacag 780
 5 caggcggaaa acgcatcggc aaaaaaacct acccttcccg ccgccaacga aatggcgcgt 840
 atcgaaggca aaagcctgat tgttttggc gactacggca gaaactggcg gcgcaccgtg 900
 ctgcccctcg accgcatcgg gctgaccgtc gtcggtcaaa acaccgaacg ccacgccttc 960
 ctggttcaaa aagccccgaa cgaaagcaat gcagttaccg aacaaaaacc cggcctgttc 1020
 aaacgcctgc tgggcaaagg caaagcggag aaacctgccg aacagccgga actgattgtc 1080
 10 tatgcagaac ctgtcgcaa cggtcgcgc atcgtcctgc tcaacaaaga cggcagcgca 1140
 tatgccggca aagacgcacg cgcatattg ggcaactcc attccgaact gcgttaa 1197

<210> 4

15 <211> 357

<212> PRT

<213> Neisseria meningitidis

<400> 4

20 Cys Ser Gly Ser Lys Thr Glu Gln Pro Lys Leu Asp Tyr Gln Ser Arg
 1 5 10 15

Ser His Arg Leu Ile Lys Leu Glu Val Pro Pro Asp Leu Asn Asn Pro
 20 25 30

25 Asp Gln Gly Asn Leu Tyr Arg Leu Pro Ala Gly Ser Gly Ala Val Arg
 35 40 45

30 Ala Ser Asp Leu Glu Lys Arg Arg Thr Pro Ala Val Gln Gln Pro Ala
 50 55 60

Asp Ala Glu Val Leu Lys Ser Val Lys Gly Val Arg Leu Glu Arg Asp
 65 70 75 80

35 Gly Ser Gln Arg Trp Leu Val Val Asp Gly Lys Ser Pro Ala Glu Ile
 85 90 95

Trp Pro Leu Leu Lys Ala Phe Trp Gln Glu Asn Gly Phe Asp Ile Lys
 100 105 110

40 Ser Glu Glu Pro Ala Ile Gly Gln Met Glu Thr Glu Trp Ala Glu Asn
 115 120 125

45 Arg Ala Lys Ile Pro Gln Asp Ser Leu Arg Arg Leu Phe Asp Lys Val
 130 135 140

Gly Leu Gly Gly Ile Tyr Ser Thr Gly Glu Arg Asp Lys Phe Ile Val
 145 150 155 160

Arg Ile Glu Gln Gly Lys Asn Gly Val Ser Asp Ile Phe Phe Ala His
 165 170 175

5 Lys Ala Met Lys Glu Val Tyr Gly Gly Lys Asp Lys Asp Thr Thr Val
 180 185 190

Trp Gln Pro Ser Pro Ser Asp Pro Asn Leu Glu Ala Ala Phe Leu Thr
 195 200 205

10 Arg Phe Met Gln Tyr Leu Gly Val Asp Gly Gln Gln Ala Glu Asn Ala
 210 215 220

Ser Ala Lys Lys Pro Thr Leu Pro Ala Ala Asn Glu Met Ala Arg Ile
 15 225 230 235 240

Glu Gly Lys Ser Leu Ile Val Phe Gly Asp Tyr Gly Arg Asn Trp Arg
 245 250 255

20 Arg Thr Val Leu Ala Leu Asp Arg Ile Gly Leu Thr Val Val Gly Gln
 260 265 270

Asn Thr Glu Arg His Ala Phe Leu Val Gln Lys Ala Pro Asn Glu Ser
 275 280 285

25 Asn Ala Val Thr Glu Gln Lys Pro Gly Leu Phe Lys Arg Leu Leu Gly
 290 295 300

Lys Gly Lys Ala Glu Lys Pro Ala Glu Gln Pro Glu Leu Ile Val Tyr
 30 305 310 315 320

Ala Glu Pro Val Ala Asn Gly Ser Arg Ile Val Leu Leu Asn Lys Asp
 325 330 335

35 Gly Ser Ala Tyr Ala Gly Lys Asp Ala Ser Ala Leu Leu Gly Lys Leu
 340 345 350

His Ser Glu Leu Arg
 355

40

<210> 5
 <211> 1058
 <212> ADN

45 <213> Neisseria meningitidis

<400> 5
 ggcagcaaaa ccgaacagcc caagctcgac taccaaagcc ggtcgaccgc cctgatcaaa 60

```

5   cttgaagtc cactgattt gaacaacccc gaccaaggca acctctaccg cctgcctgcc 120
    ggttcgggcg ccgtccgcgc cagcaatttg gaaaaacgcc gcacaccacac cgtccaacag 180
    cctgccgatg ccgaagtatt gaaaagcgtc aaaggtgtcc gcctcgagcg cgacggcagc 240
    caacgctggc tegtgtgcga cggcaagtct cctgccgaaa tctggccgct cctgaaagcc 300
    ttttggcagg aaaacggctt cgacatcaaa tccgaagaac ccgccatcgg acaaaaggaa 360
    accgagtggg cggaaaaccg cgccaaaatc cccaagaca gcttgcgccc cctcttcgac 420
    aaagtcgggt tgggcggcat ctactccacc ggcgagcgcg acaaattcat cgtccgtatc 480
    gaacagggca aaaacggcgt ttccgacatc ttcttcgccc acaaagccat gaaagaagtg 540
    tacggcggca aagacaaaaga cagaccgta tggcagccct ccccgtcga tcccaacctc 600
10  gaagccgctt tcctgacgcg ctttatgcaa tatttgggcy ttgacggaca gcaggcggaa 660
    aacgcatcgg caaaaaaacc tacccttccc gccgccaacg aaatggcgcg tatcgaaagc 720
    aaaagcctga ttgtctttgg cgactacggc agaaactggc ggcgacccgt gctcgccctc 780
    gaccgcatcg ggctgaccgt cgtcggtaaa aacaccgaac gccacgcctt cctgggtcaa 840
    aaagccccga acgaaagcaa tgcagttacc gaacaaaaac ccggcctgtt caaacgcctg 900
15  ctgggcaaaag gcaaagcgga gaaacctgcc gaacagccgg aactgattgt ctatgcagaa 960
    cctgtcgcca acgggtcgcg catcgtcctg ctcaacaaaag acggcagcgc atatgccggc 1020
    aaagacgcat ccgcattatt gggcaaacct cattccga 1058

```

20 <210> 6
 <211> 1058
 <212> ADN
 <213> Neisseria meningitidis

```

25  <400> 6
    ggcagcaaaa ccgaacagcc caagctcgac taccaaagcc ggtcgcaccg cctgatcaaa 60
    cttgaagtc cactgattt gaacaacccc gaccaaggca acctctaccg cctgcctgcc 120
    ggttcgggcy ccgtccgcgc cagcgatttg gaaaaacgcc gcacaccacac cgtccaacag 180
    cctgccgatg ccgaagtatt gaaaagcgtc aaaggtgtcc gcctcgagcg cgacggcagc 240
30  caacgctggc tegtgtgcga cggcaagtct cctgccgaaa tctggccgct cctgaaagcc 300
    ttttggcagg aaaacggctt cgacatcaaa tccgaagaac ccgccatcgg acaaaaggaa 360
    accgagtggg cggaaaaccg cgccaaaatc cccaagaca gcttgcgccc cctcttcgac 420
    aaagtcgggt tgggcggcat ctactccacc ggcgagcgcg acaaattcat cgtccgtatc 480
    gaacagggca aaaacggcgt ttccgacatc ttcttcgccc acaaagccat gaaagaagtg 540
35  tacggcggca aagacaaaaga cagaccgta tggcagccct ccccgtcga tcccaacctc 600
    gaagccgctt tcctgacgcg ctttatgcaa tatttgggcy ttgacggaca gcaggcggaa 660
    aacgcatcgg caaaaaaacc tacccttccc gccgccaacg aaatggcgcg tatcgaaagc 720
    aaaagcctga ttgtctttgg cgactacggc agaaactggc ggcgacccgt gctcgccctc 780
    gaccgcatcg ggctgaccgt cgtcggtaaa aacaccgaac gccacgcctt cctgggtcaa 840
40  aaagccccga acgaaagcaa tgcagttacc gaacaaaaac ccggcctgtt caaacgcctg 900
    ctgggcaaaag gcaaagcgga gaaacctgcc gaacagccgg aactgattgt ctatgcagaa 960
    cctgtcgcca acgcctcgcg catcgtcctg ctcaacaaaag acggcagcgc atatgccggc 1020
    aaagacgcat ccgcattatt gggcaaacct cattccga 1058

```

45 <210> 7
 <211> 1058
 <212> ADN
 <213> Neisseria meningitidis

```

50  <400> 7
    ggcagcaaaa ccgaacagcc caagctcgac taccaaagcc ggtcgcaccg cctgatcaaa 60
    cttgaagtc cactgattt gaacaacccc gaccaaggca acctctaccg cctgcctgcc 120
    ggttcgggcy ccgtccgcgc cagcaatttg gaaaaacgcc gcacaccacac cgtccaacag 180
    cctgccgatg ccgaagtatt gaaaagcgtc aaaggtgtcc gcctcgagcg cgacggcagc 240
55  caacgctggc tegtgtgcga cggcaagtct cctgccgaaa tctggccgct cctgaaagcc 300

```

5 ttttggcagg aaaacggctt cgacatcaaa tccgaagaac ccgccatcgg acaaaaggaa 360
 accgagtggg cggaaaaccg cgccaaaatc ccccaagaca gcttgcgccg cctcttcgac 420
 aaagtccggt tgggcgccat ctactccacc ggcgagcgcg acaaattcat cgtccgtatc 480
 gaacagggca aaaacggcgt ttccgacatc ttcttcgccc acaaagccat gaaagaagtg 540
 10 tacggcggca aagacaaaga cagcaccgta tggcagccct ccccgccga tcccaacctc 600
 gaagccgctt tcctgacgcg ctttatgcaa tatgtggcg ttgacggaca gcaggcggaa 660
 aacgcatcgg caaaaaaacc tacccttccc gccgccaacg aaatggcgcg tatcgaaagc 720
 aaaagcctga ttgtctttgg cgactacggc agaaaactggc ggcgcacggt gctcgccctc 780
 gaccgcatcg ggctgaccgt cgtcgggtcaa aacaccgaac gccacgcctt cctgggtcaa 840
 10 aaagccccga acgaaagcaa tgcagttacc gaacaaaaac ccggcctgtt caaacgcctg 900
 ctgggcaaaag gcaaagcgga gaaacctgcc gaacagccgg aactgattgt ctatgcagaa 960
 cctgtcgcca acgcgtcgcg catcgtcctg ctcaacaaag acggcagcgc atatgccggc 1020
 aaagacgcat ccgcattatt gggcaaac tcattccga 1058

15

<210> 8

<211> 29

<212> ADN

<213> Secuencia nucleotídica del oligonucleotido sintético 1573

20

<400> 8

ttccatggta gataaaagaa tggctttag

29

25

<210> 9

<211> 27

<212> ADN

<213> Secuencia nucleotídica del oligonucleotido sintético 6795


30

<400> 9

aactgcaggc ttgtaaaccg tttgtg

27

35


 Lic. Argia Poveda Marcheco
 Representante Legal, CIGB



REIVINDICACIONES.

PROTEÍNA NMB0928 Y SU USO EN FORMULACIONES FARMACÉUTICAS.

- 5 1. Proteína de *N. meningitidis* denominada NMB0928 caracterizada por ser un antígeno capaz de generar en el organismo receptor una respuesta protectora contra infecciones causadas por bacterias del género *Neisseria* y tener la secuencia aminoacídica identificada en el listado de secuencias como Secuencia 4.
- 10 2. Proteína denominada NMB0928, de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada por estar codificada por el gen NMB0928 identificado en el listado de secuencias como Secuencia 3.
- 15 3. Gen NMB0928 de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizado por tener la secuencia de bases identificada en el listado de secuencias como Secuencia 3 y codificar para la proteína de la reivindicación 1.
- 20 4. Proteína o péptido obtenido por vía recombinante o por síntesis química caracterizada porque tiene la secuencia de la proteína NMB0928 y ser capaz de generar en el organismo receptor una respuesta protectora contra infecciones causadas por bacterias del género *Neisseria* de acuerdo con la reivindicación 1.
- 25 5. Formulación farmacéutica caracterizada porque contiene la proteína o el péptido de las reivindicaciones 1, 2 y 4, o la proteína de la reivindicación 1 producida de manera natural, de acuerdo con la reivindicaciones 1, 2 y 4.
- 30 6. Formulación farmacéutica de la reivindicación 5 caracterizada porque es una vacuna capaz de generar en el organismo receptor una respuesta protectora contra infecciones causadas por bacterias del género *Neisseria*.
7. Formulación farmacéutica de acuerdo con las reivindicaciones 5 y 6 caracterizada porque es una vacuna capaz de generar en el organismo receptor

una respuesta protectora contra infecciones causadas por *Neisseria meningitidis*.

- 5 8. Formulaci3n farmac3utica de acuerdo con las reivindicaciones 5 y 6 caracterizada porque es una vacuna capaz de generar en el organismo receptor una respuesta protectora contra infecciones causadas por *Neisseria gonorrhoeae*.
- 10 9. Formulaci3n farmac3utica de acuerdo con las reivindicaciones 5, 6, 7 y 8, caracterizada por ser una formulaci3n profil3ctica o terap3utica.
- 15 10. Formulaci3n farmac3utica de acuerdo con las reivindicaciones 5, 6, 7 y 8, caracterizada porque es una formulaci3n combinada conteniendo uno o varios ant3genos de naturaleza antig3nica diferente, obtenidos por v3a recombinante, por v3a sint3tica o producidos de manera natural.
- 20 11. Formulaci3n farmac3utica de acuerdo con las reivindicaciones 5, 6, 7 y 8, caracterizada porque contiene ant3genos polisac3ridicos.
- 25 12. Formulaci3n farmac3utica de acuerdo con las reivindicaciones 5, 6, 7 8 y 9, caracterizada porque uno de los componentes de la formulaci3n es un polisac3rido capsular de *N. meningitidis*.
- 30 13. Formulaci3n farmac3utica de acuerdo con la reivindicaci3n 9, caracterizada porque contiene un conjugado prote3na-polisac3rido, cuya porci3n polisac3r3dica se corresponde con un polisac3rido bacteriano.
14. Formulaci3n farmac3utica de acuerdo con las reivindicaciones 5, 6, 7 y 8, caracterizada porque contiene uno o varios microorganismos inactivados.
15. Formulaci3n farmac3utica de acuerdo con las reivindicaciones 5, 6, 7 y 8, caracterizada porque contiene ant3genos pept3dicos.

16. Formulaci3n farmac3utica de acuerdo con las reivindicaciones 5 y 6, caracterizada porque contiene hormonas.
- 5 17. Formulaci3n farmac3utica de acuerdo con las reivindicaciones 5 y 6, caracterizada porque contiene factores de crecimiento.
- 10 18. Formulaci3n farmac3utica de acuerdo con las reivindicaciones de la 5 a la 17 caracterizada porque es una formulaci3n para ser administrada por v3a parenteral.
- 15 19. Formulaci3n farmac3utica de acuerdo con las reivindicaciones de la 5 a la 17 caracterizada porque es una formulaci3n para ser administrada por v3a mucosal.
- 20 20. Formulaci3n farmac3utica de acuerdo con las reivindicaciones de la 5 a la 17 caracterizada porque es una formulaci3n para ser administrada por v3a oral.
- 25 21. Formulaci3n farmac3utica de acuerdo con las reivindicaciones de la 5 a la 20 caracterizada por ser una formulaci3n inmunoestimulante o inmunopotenciadora.
- 30 22. Formulaci3n farmac3utica de acuerdo con las reivindicaciones de la 5 a la 21 caracterizada porque contiene p3ptidos o fragmentos del ant3geno NMB0928.
23. Formulaci3n farmac3utica de acuerdo con las reivindicaciones de la 5 a la 21 caracterizada porque contiene mimotopos del ant3geno NMB0928.
24. Organismo gen3ticamente modificado caracterizado porque contiene el gen de la reivindicaci3n 3, o parte de este, solo o formando parte de otra secuencia g3nica.

25. Formulaci3n farmac3utica de acuerdo con la reivindicaci3n 24 caracterizada porque contenga el organismo gen3ticamente modificado vivo, atenuado o un preparado de este.
- 5 26. Formulaci3n farmac3utica caracterizada porque contiene la prote3na expresada por el organismo de la reivindicaci3n 24, y es capaz de generar en el organismo receptor una respuesta protectora contra infecciones causadas por bacterias del g3nero Neisseria.
- 10 27. Formulaci3n farmac3utica caracterizada porque contiene la prote3na o el p3ptido de las reivindicaciones 1, 2 y 4, como portadora de ant3genos de diversa naturaleza.
- 15 28. Componente farmac3utico caracterizado porque contiene la prote3na NMB0928 de las reivindicaciones 1 y 2, o fragmentos de esta y es capaz de permitir la detecci3n, solo o de conjunto con otros componentes, la enfermedad meningoc3ccica en humanos.
- 20 29. Componente farmac3utico caracterizado porque contiene el gen de la reivindicaci3n 3, o fragmentos de este y es capaz de permitir la detecci3n, solo o de conjunto con otros componentes, la enfermedad meningoc3ccica en humanos.
- 25 30. Uso de la prote3na NMB0928 o fragmentos de esta, de acuerdo con las reivindicaciones 1 y 2, en biosensores u otras aplicaciones farmac3uticas o biotecnol3gicas.
- 30 31. Uso del gen NMB0928, de acuerdo con las reivindicaci3n 3, o fragmentos de este, en biosensores u otras aplicaciones farmac3uticas o biotecnol3gicas.

Lic. Argia Poveda Marcheco
Representante Legal, CIGB

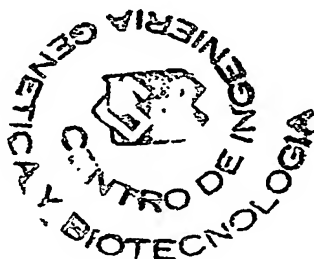


Figura 1

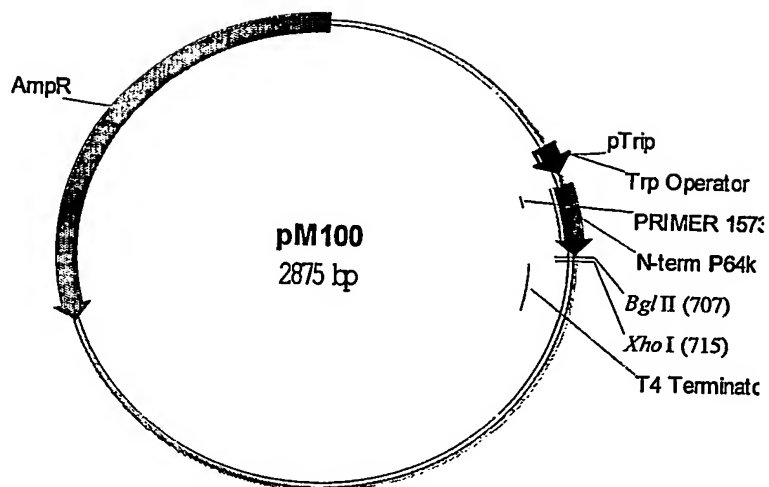


Figura 2

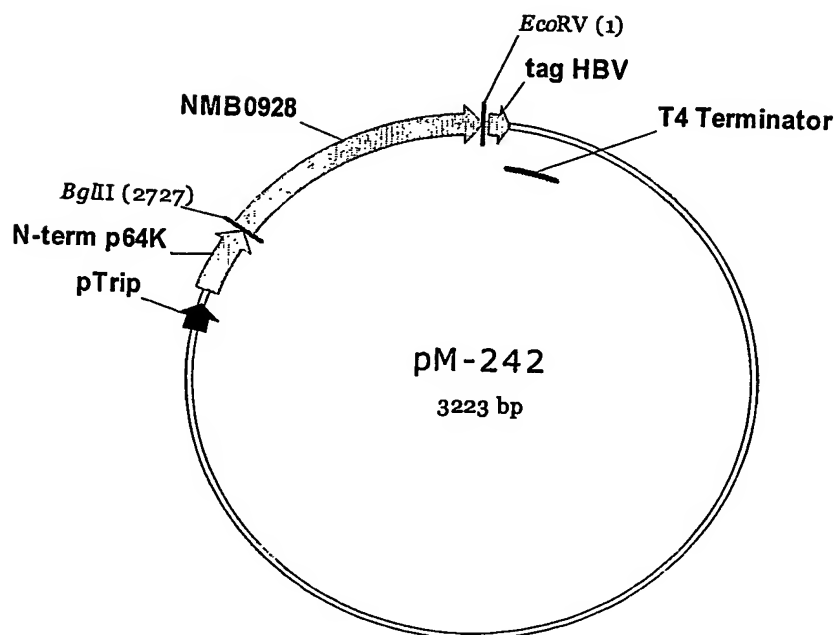


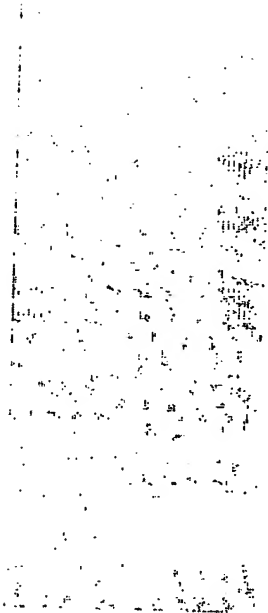
Figura 3



Handwritten signature.

1

2



NMB0928



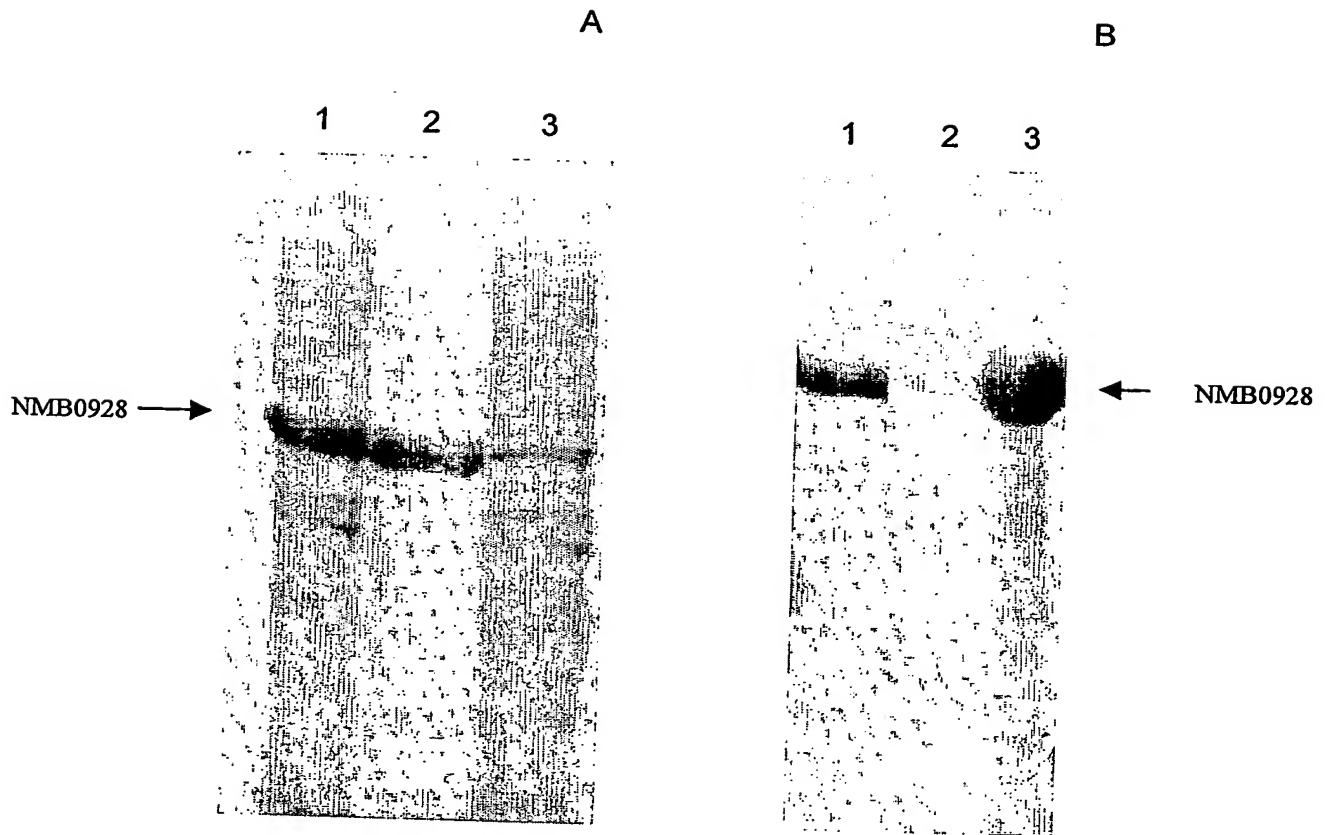
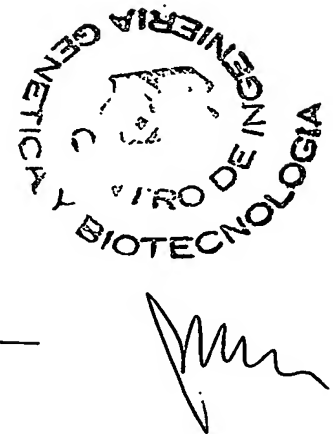
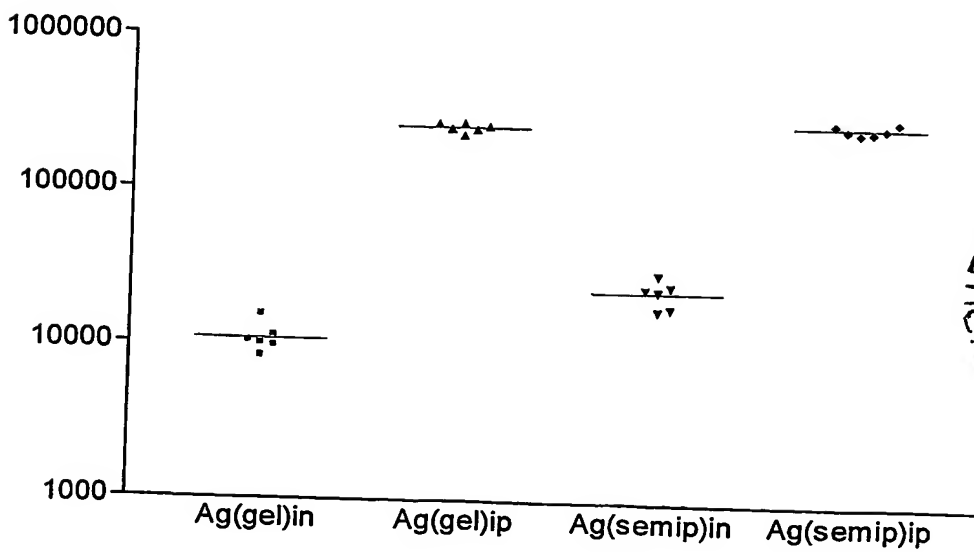
Figura 4**Figura 5**

Figura 6

1 2



← NMB0928



Figura 7

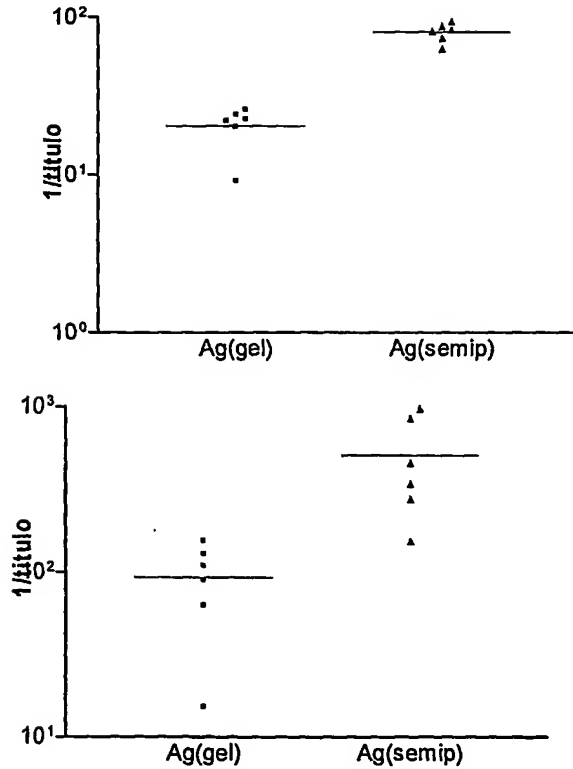


Figura 8

Neisseria meningitidis serogrupo C
 >Neisseria meningitidis FAM18:orf94 108496 109923 PIR:C81141
 hypothetical protein NMB0928 [imported] - Neisseria
 meningitidis (group B strain MD58)
 Length = 1428

Score = 1939 bits (978), Expect = 0.0
 Identities = 1038/1058 (98%)
 Strand = Plus / Plus

Query: 2 ggcagcaaaaccgaacagcccaagctcgactaccaagccggtcgacccgcctgatcaaa 61
 |||
 Sbjct: 364 ggcagcaaaaccgaacagcccaagctcgactaccaagccggtcgacccgcctgatcaaa 423

Query: 62 cttgaagtccacctgatttgaacaaccocgaccaaggcaacctctaccgcctgectgcc 121
 |||
 Sbjct: 424 ctcgaagtccacctgatttgaacaaccocgaccaaggcaacctctaccgcctgectgcc 483



Min

Query: 962 cctgtcgccaacggtcgcgcatcgctcctgtcaacaagaacggcagcgcatatgccggc 1021
 |||||
 Sbjct: 1324 cctgtcgccaacggtcgcgcatcgctcctgtcaacaagaacggcagcgcatatgccggc 1383

Query: 1022 aaagacgcatccgcattattgggcaaaactccattccga 1059
 |||||
 Sbjct: 1384 aaagacgcatccgcattattgggcaaaactccattccga 1421

Neisseria meningitides serogrupo A
 >Nmeningitidis Z2491:gi 7379817 1073887 1072760 putative
 lipoprotein [Neisseria meningitidis Z2491]
 Length = 1128

Score = 1963 bits (990), Expect = 0.0
 Identities = 1041/1058 (98%)
 Strand = Plus / Plus

Query: 2 ggcagcaaaaccgaacagcccaagctcgactaccaagccggtcgacccgcctgatcaaa 61
 |||||
 Sbjct: 61 ggcagcaaaaccgaacagcccaagctcgactaccaagccggtcgacccgcctgatcaaa 120

Query: 62 cttgaagtccacctgatttgaacaaccccgaccaaggcaacctctaccgcctgctgccc 121
 || |||||
 Sbjct: 121 ctogaagtccacctgatttgaacaaccccgaccaaggcaacctctaccgcctgctgccc 180

Query: 122 ggttcggggcgccgtccgcgccagcaatttggaaaaacgcgcacacccaccgtccaacag 181
 |||||
 Sbjct: 181 ggttcggggcgccgtccgcgccagcatttggaaaaacgcgcacacccaccgtccaacag 240

Query: 182 cctgccgatgccgaagtattgaaaagcgtcaaagggtgtccgcctcgagcgcgacggcagc 241
 |||||
 Sbjct: 241 cctgccgatgccgaagtattgaaaagcgtcaaagggtgtccgcctcgagcgcgacggcagc 300

Query: 242 caacgctggctcgttgcgacggcaagtctcctgccgaaatctgcccgtcctgaaagcc 301
 |||||
 Sbjct: 301 caacgctggctcgttgcgacggcaagtctcctgccgaaatctgcccgtcctgaaagcc 360

Query: 302 ttttggcaggaaaacggcttcgacatcaaattcgaagaacccgccatcggaacaaaggaa 361
 |||||
 Sbjct: 361 ttttggcaggaaaacggcttcgacatcaaattcgaagaacccgccatcggaacaaaggaa 420

Query: 362 accgagtgggcggaacacggcgcacaaatcccccaagacagcttgcgcgcctcttcgac 421
 |||||
 Sbjct: 421 accgagtgggcggaacacggcgcacaaatcccccaagacagcttgcgcgcctatttcgac 480

Query: 422 aaagtgcggttggggcgcatctactccacggcgagcgcgacaaattcatcgctccgtatc 481
 |||||
 Sbjct: 481 acagtgcggttggggcgcatctactccacggcgagcgcgacaaattcatcgctccgtatc 540

Query: 482 gaacaggggcaaaaacggcgtttccgacatcttcttcgcccacaaagccatgaaagaagtg 541
 |||||
 Sbjct: 541 gaacaggggcaaaaacggcgtttccgacatcttcttcgcccacaaagccatgaaagaagtg 600

Query: 542 tacggcgggcaaaagacaaagacagaccgtatggcagccctccccgtccgatcccaacctc 601
 |||||
 Sbjct: 601 tacggcgggcaaaagacaaagacagaccgtatggcagccctccccgtccgatcccaacctc 660

Query: 602 gaagccgcttctcgtacgcgctttatgcaatatttggggcgttgacggacagcaggcgga 661



Score = 2042 bits (1030), Expect = 0.0
Identities = 1051/1058 (99%)
Strand = Plus / Plus



D

1



10/14

meningitidis (group B strain MD58)
Length = 1428

Score = 1685 bits (850), Expect = 0.0
Identities = 1006/1058 (95%)
Strand = Plus / Plus

Query: 2 ggcagcaaaaccgaacagcccaagctcgactaccaaagccggtcgacccgctgatcaaa 61
|||||
Sbjct: 364 ggcagcaaaaccgaacagcccaagctcgactaccaaagccggtcgacccgctgatcaaa 423

Query: 62 cttgaagtccacctgatttgaacaaccccgaccaaggcaacctctaccgcctgcctgcc 121
|| |||||
Sbjct: 424 ctcgaagtcccgctgatttgaacaaccccgaccaaggcaacctctaccgcctgcctgcc 483

Query: 122 ggttcggggcgccgtccgcgcagcaatttgaaaaacgcgcacaccacccgctccaacag 181
|||||
Sbjct: 484 ggttcggggcgccgtccgcgcagcaatttgaaaaacgcgcacaccacccgctccaacag 543

Query: 182 cctgccgatgccgaagtattgaaaagcgtcaaagggtgtccgcctcgagcgcgacggcagc 241
|| |||||
Sbjct: 544 ccagccgatgccgaagtattgaaaagcgtcaaagggtgtccgcctcgagcgcgacggcagc 603

Query: 242 caacgctggctcgttgcgacggcaagtctcctgccgaaatctggccgctcctgaaagcc 301
|||||
Sbjct: 604 caacgctggctcgttgcgacggcaaatcccccgccgaaatctggccgcttctgaaagcc 663

Query: 302 ttttggcaggaaaacggcttcgacatcaaatccgaagaacccgccatcggacaaaaggaa 361
|||||
Sbjct: 664 ttttggcaggaaaacggcttcgacatcgaatccgaagaacccgccatcggacaaaaggaa 723

Query: 362 accgagtggcggaaaaacccgcgcaaaaatcccccaagacagcttgccgcgcctcttcgac 421
|||||
Sbjct: 724 accgagtggcggaaaaacccgtgcgcaaaaatcccccaagacagcttgccgcgcctattcgac 783

Query: 422 aaagtcggccttggcgcccatctactccacggcgagcgcgacaaaattcatcgctccgtatc 481
| |||||
Sbjct: 784 acagtcggcttggcgcccatctactccacggcgagcgcgacaaaattcatcgctccgtatc 843

Query: 482 gaacagggcaaaaacggcgtttccgacatcttcttcgcccaaaaagccatgaaagaagtg 541
|||||
Sbjct: 844 gaacagggcaaaaacggcgtttccgacatcttcttcgcccaaaaagcgatgaaagaagtg 903

Query: 542 tacggcggcaaaagacaaagacacgacgctatggcagccctcccgctcgatcccaacctc 601
|| |||||
Sbjct: 904 tatggcgacaaaacaaagacacgaccaatgtggcagccttcgcttcggaccccaacctt 963

Query: 602 gaagccgctttcctgacgcgctttatgcaatatgtggcggttgacggacagcaggcggaa 661
|| |||||
Sbjct: 964 gagccgctttcctgacgcgctttatgcaatatgtggcggttgacggacagcaggcggaa 1023

Query: 662 aacgcacgcgcaaaaaaacctacccttcccgccgccaacgaaatggcgcgatcgaaagc 721
|||||
Sbjct: 1024 aacgcattggcaaaaaaacgacccttcccgccgccaacgaaatggcgcgatcgaaagc 1083

Query: 722 aaaagcctgattgtctttggcgactacggcagaaactggcgcgacacgctgctgcctc 781
|||||
Sbjct: 1084 aaaagcctgattgtctttggcgactacggcagaaactggcgcgacacgctgctgcctc 1143



[Handwritten signature]

Query: 782 gaccgcatogggtgaccgtcgtcggtcaaaacaccgaacgccacgccttcctgggtcaa 841
|||||
Sbjct: 1144 gaccgcatcggactgaccgtcgtcggtcaaaacaccgaacgccacgccttcctgggtcaa 1203
|||||

Query: 842 aaagccccgaacgaaagcaatgcagttaccgaacaaaaaccggcgtgttcaaagcctg 901
|||||
Sbjct: 1204 aaagccccgaacgaaagcaatgcagttaccgaacaaaaaccggggtgttcaaagccta 1263
|||||

Query: 902 ctgggcaaaggcaaagcggagaaacctgccgaacagccggaactgattgtctatgcagaa 961
|||||
Sbjct: 1264 ctgggcaaaggcaaagcggagaaacctgccgaacagccggaactgattgtctatgcagag 1323
|||||

Query: 962 cctgtcgccaacgcgtcgcgcatcgctcctgctcaacaaagacggcagcgcatatgccggc 1021
|||||
Sbjct: 1324 cctgtcgcgacgggttcgcgcatcgctcctgctcaacaaagacggcagcgcatatgccggc 1383
|||||

Query: 1022 aaagacgcacccgcattattgggcaaactccattccga 1059
|||||
Sbjct: 1384 aaagacgcacccgcactgtaggcaaactccattccga 1421
|||||



Figura 9

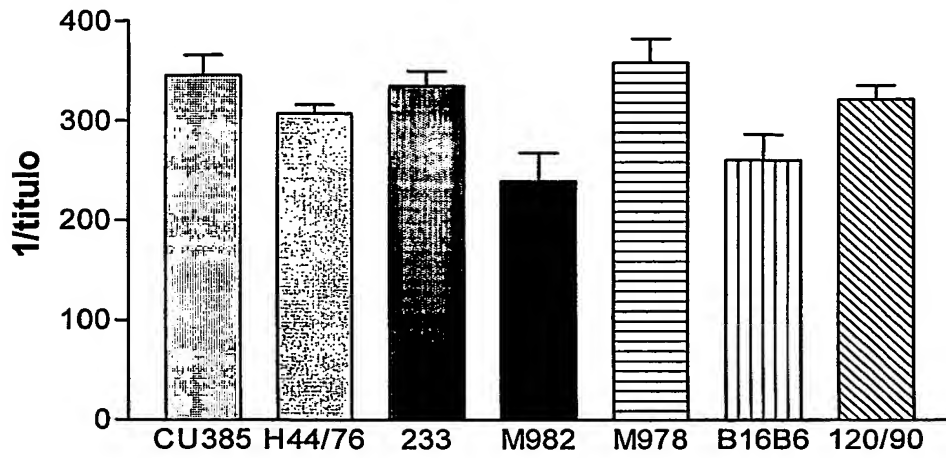


Figura 10

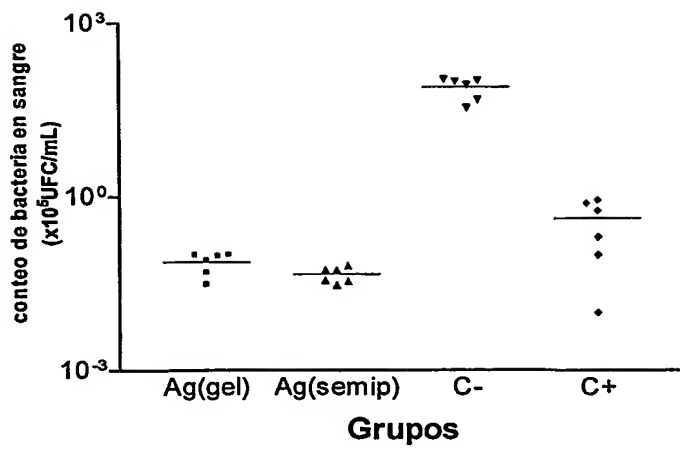


Figura 11

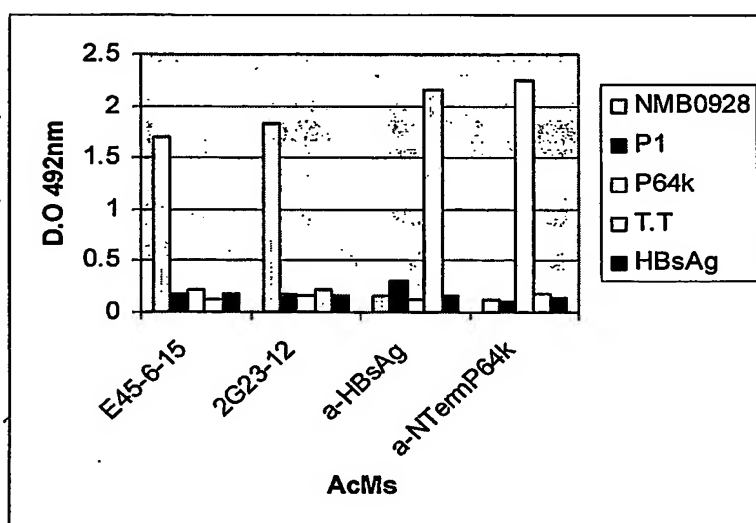
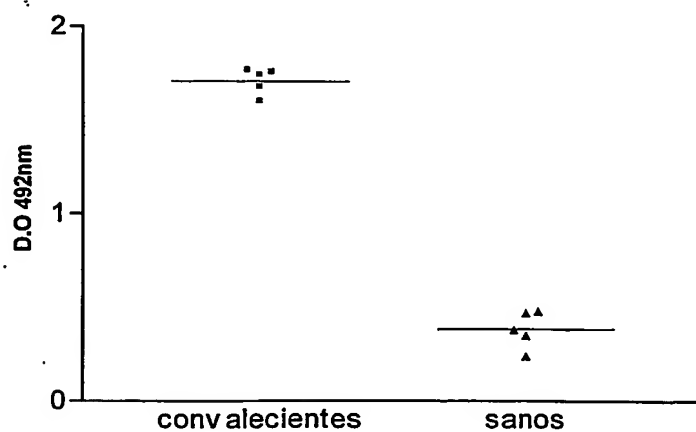
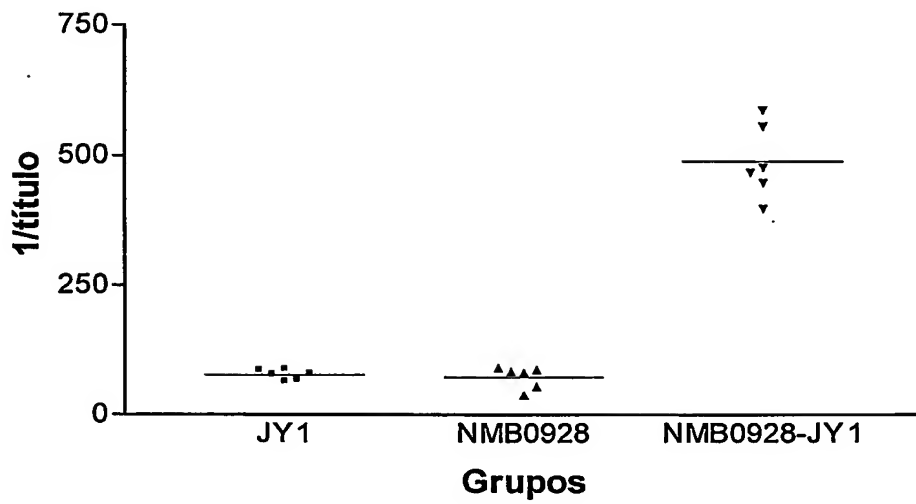


Figura 12



Handwritten signature.

Figura 13



Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/CU04/000016

International filing date: 02 December 2004 (02.12.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: CU
Number: CU2003/0286
Filing date: 03 December 2003 (03.12.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 07 January 2005 (07.01.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.